

بررسی بیوانفورماتیکی ژن کد کننده ی پپتید شبه آنتی تومور- ضددرد از عقرب زرد ایرانی (*Mesobuthus eupeus*)

زینب دهقان، هدا آیت*، علی محمد احدی

گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۱

چکیده:

زمینه و هدف: در سال های اخیر مطالعات متعددی بر روی سموم حیوانات و حشرات برای یافتن مولکول هایی با خواص دارویی انجام شده است. سموم عقرب دارای مولکول های کوچکی با خواص زیستی و دارویی مختلف می باشند. یکی از این توکسین ها پپتید آنتی تومور- ضددرد (AGAP) است که در درمان سرطان و تسکین درد موثر می باشد. در این مطالعه تحقیقی به تعیین توالی و بررسی های بیوانفورماتیکی ژن کدکننده ی پپتید شبه AGAP از عقرب زرد ایرانی پرداخته شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، نمونه های عقرب زرد ایرانی *Mesobuthus eupeus* جمع آوری و پس از استخراج DNA با پرایم های اختصاصی نواحی حفاظت شده، تکثیر ژن کدکننده ی پپتید سمی مشابه AGAP انجام شد و (*Mesobuthus eupeus* Iranian AGAP (MeI AGAP نام گرفت. سپس توالی ژن شبه AGAP جهت بررسی های قرابتی با کمک نرم افزار CLC main workbench 5 با توالی های سموم مشابه از گونه های دیگر عقرب مقایسه شد؛ همچنین توالی اینترون، عناصر تنظیمی، جایگاه های پیرایش و موقعیت آدنین نقطه ی شاخه ساز این توکسین با توالی های مشابه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: توالی ژنی MeI AGAP در حدود ۵۰۷ نوکلئوتید دارد. توالی ژنی این توکسین کوتاه تر از توالی ژنی توکسین BmK AGAP به دست آمده از عقرب *Buthus martensii* می باشد که علت آن حذف بزرگی در توالی اینترون آن است. توالی کدکننده ی پپتید بالغ در این توکسین تشابه ۹۳٪ با توکسین BmK AGAP دارد. مطالعه ی توالی ژنی توکسین MeI AGAP از عقرب ایرانی مزوبوتوس اوپتوس تاکنون انجام نشده و گزارش توالی آن برای نخستین بار، در این مطالعه صورت گرفت.

نتیجه گیری: بررسی همولوژی این توکسین با توکسین های دیگر از عقرب های مختلف، تفاوت های متعددی نشان داد که می تواند خاص گونه ی ایرانی باشد؛ همچنین تشابه زیاد با توکسین BmK AGAP، MeI AGAP را به عنوان دارویی برای درمان سرطان و تسکین درد مطرح می کند.

واژه های کلیدی: پپتید مشابه آنتی تومور- ضددرد، توالی بای ژنی، فاکتورهای تنظیمی اینترون، عقرب مزوبوتوس اوپتوس ایرانی.

مقدمه:

دارد که شامل ۳۰ گونه، ۱۸ زیرگونه و ۱۷ جنس می باشند. یکی از مهم ترین گونه های ایرانی *Mesobuthus eupeus* است (۲). ۱۵۰۰ گونه ی مختلف از عقرب در سراسر دنیا وجود دارد که زهر آن ها شامل بیش از ۱۰۰/۰۰۰ پپتید مختلف با

عقرب ها از قدیمی ترین موجودات روی کره ی زمین هستند، با وجود اینکه بیش از ۴۰۰ میلیون سال از تکامل آن ها می گذرد، از لحاظ فنوتیپی دچار تغییرات زیادی نشده اند (۱). در ایران دو خانواده عقرب Buthidae و Scorpionidae وجود

فعالیت های زیستی متنوع است. از بین این پپتیدها نوروتوکسین ها با وزن مولکولی ۹-۳ کیلودالتون دارای کاربردهای درمانی گوناگونی هستند. گروهی از این نوروتوکسین ها که بر روی کانال ها اثر دارند به ۴ دسته ی موثر بر کانال های کلر، موثر بر کانال های پتاسیم، موثر بر کانال های کلسیم و موثر بر کانال های سدیم طبقه بندی می شوند (۳). MeICT ازجمله توکسین های موثر بر کانال های کلر می باشد که می تواند در درمان سرطان گلیوما موثر باشد و توالی نوکلئوتیدی و آنالیزهای بیوانفورماتیکی آن مورد مطالعه قرار گرفته است (۴). Kalitoxin از توکسین های موثر بر کانال های پتاسیم می باشد. این توکسین بر روی کانال های Kv1.1 و Kv1.3 که در فرایند حافظه و یادگیری نقش دارند، موثر می باشد (۵). Kurtoxin از توکسین های موثر بر کانال های کلسیمی می باشد که با مهار کانال های کلسیمی نوع T، از آسیب های نوروئی جلوگیری می کنند (۶). کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ نقش مهمی در ایجاد درد دارند. مطالعات متعددی نشان داده که توکسین های موثر بر کانال های سدیمی می توانند برای درمان انواع دردها ازجمله سردرد، دردهای روماتیسمی و دردهای سرطان موثر باشند؛ همچنین دیده شده که این نوروتوکسین ها روی کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ Nav1.5 که در سلول های سرطانی بیان بالایی دارد و در مهاجرت و همانندسازی سلول موثر است، اثر گذاشته و میزان بیان این کانال ها را پایین می آورند. آنالیز توالی نوکلئوتیدی توکسین های موثر بر کانال های سدیمی نشان داد که pre mRNA آن ها ۹۵۰-۶۵۰ نوکلئوتید دارد که شامل یک اینترون ۶۲۰-۳۰۰ نوکلئوتیدی و ۲ اگزون می باشند (۷). با استفاده از آنالیزهای آماری و جهش زایی مشخص شده که توالی های نوکلئوتیدی ویژه ای در اینترون ژن توکسین های موثر بر کانال های سدیمی وجود دارند که در نسخه برداری از این ژن ها نقش مهمی را ایفا می کنند، ازجمله این عناصر تنظیمی

نسخه برداری می توان CATG، CAAT، TGAA(TTCA)، و CAAAAT را نام برد (۸). پپتید آنتی تومور-ضددرد BmK AGAP از سم عقرب چینی بوتوس مارتنسی استخراج شده است و دارای ۶۶ اسید آمینه می باشد، BmK AGAP بر روی کانال های سدیمی درگیر در درد تأثیر گذاشته و با فعال نگهداشتن این کانال ها باعث تسکین درد می شود، این توکسین همچنین بسیاری از فاکتورهای زیستی درگیر در پیشرفت سرطان ازجمله فاکتورهای درگیر در سیکل سلولی، آپوپتوز و متاستاز سلول ها را مورد هدف قرار می دهد و به عنوان داروی موثری در درمان سرطان گزارش شده است (۹-۱۳). ۳ دسته از عناصر تنظیمی نسخه برداری در اینترون این ژن وجود دارند: ۱- عناصر شبه- پروموتور (CAAAT, TATA, ATTA, AAAT, CTAATTTAAT)؛ ۲- عناصر تشدید کننده (TGGAAA)؛ ۳- جایگاه باند شدن فاکتورهای نسخه برداری (ATGACTAAT). با آنالیز ساختار ثانویه RNA مشخص شده است که نوکلئوتید A نقطه شاخه ساز روی لوپ سنجاق سری، لوپ بزرگ و یا روی ساقه قرار گرفته است. در BmK AGAP نیز A نقطه شاخه ساز ۵۰-۱۰ bp در بالادست G جایگاه پردازش ۳' قرار دارد که این ساختار کمندی برای پردازش mRNA مهم می باشد (۱۴).

باتوجه به اهمیت این پپتید آنتی تومور-ضددرد (AGAP) و عدم مطالعه پپتیدهای مشابه آن در عقرب های ایرانی، در این مطالعه تحقیقی به تعیین توالی و بررسی های بیوانفورماتیکی روی ژن این توکسین با توالی های مشابه گزارش شده، پرداخته شد.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی، نمونه های عقرب زنده پس از جمع آوری و بررسی مورفولوژیکی دقیق توسط متخصص مربوطه، به صورت زنده به

باتوجه به حداکثر نقاط تشابه بین ژن‌های مشابه پرایمرها طراحی شدند. از پرایمرهای زیر برای تکثیر ژن استفاده گردید.

پرایمر پیشرو (Fagp)

GCTTTCCCAGAAAATTCCGTAAAACG

پرایمر پیرو (Ragp)

TGTAATTTTATTATTTATGTTTATTTAAC

پرایمر پیرو برای انجام PCR نستد (Ragpn)

CATTGCATTTTCCTGGTACTCTAATAG

واکنش PCR برای تکثیر ژن با تعداد ۴۰ سیکل و دمای واسرشتگی 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها $64-56^{\circ}\text{C}$ به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر 72°C به مدت ۳۰ ثانیه به روش Touch-down انجام گرفت، پرایمرها نیز در دمای Hotstart اضافه شدند. بافر PCR با غلظت ۱۰x به میزان ۲/۵ میکرولیتر، کلرید منیزیم با غلظت ۵۰ میلی مولار به میزان ۰/۷۵ میکرولیتر، dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار به میزان ۱ میکرولیتر، آنزیم taq پلی مرز برابر ۱ واحد و پرایمرهای پیشرو و پیرو با غلظت های ۱۰ میلی مولار به میزان ۱ میکرولیتر، DNA به میزان ۱ میکرولیتر و اضافه کردن آب استریل تا رسیدن حجم واکنش به ۲۵ میکرولیتر استفاده شد؛ سپس ۲ میکرولیتر از محصول حاصل از این واکنش با دمای اتصال 56°C و با پرایمرهای پیشرو و پرایمر نستد واکنش PCR انجام گرفت، پرایمرها نیز در دمای Hotstart اضافه شدند. محصول حاصل از PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت و با پرایمرهای پیشرو و نستد تعیین توالی گردید. درنهایت توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزارهای CLC workbench 5، RNAFOLD و پایگاه اطلاعاتی Transcriptional Regulatory Element Database مورد آنالیزهای بیوانفورماتیکی قرار گرفت.

آزمایشگاه منتقل شده و سپس توسط کلروفرم بیهوش شده و در دمای 70°C قرار گرفت تا برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گیرد.

استخراج DNA به روش فنل - کلروفرم انجام

گرفت که مختصراً به شرح زیر می باشد.

ناحیه شکم و سر سینه عقرب را که در دمای

70°C - نگهداری شده بود، جدا کرده و به آن

۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز (EDTA، SDS، Tris-HCL)

اضافه شد. پس از خرد کردن و هموژنیزه کردن، به

۱ ویال ۱/۵ میلی لیتری منتقل و ۲ میکرولیتر

پروتئیناز K با غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر به آن

اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای 55°C قرار

گرفت. پس از گذشت این زمان، ویال خارج و

۵۰۰ میکرولیتر فنل - کلروفرم با نسبت (۱:۱) به آن

اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت؛

سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای

4°C سانتریفیوژ گردید. فاز رویی به یک ویال جدید

انتقال داده شد و هم حجم آن اتانول مطلق و

۳۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار اضافه و ویال

به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 20°C - قرار گرفت و

سانتریفیوژ طبق شرایط قبلی انجام شد. الکل رویی

خارج، به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪

اضافه و پس از شستشوی رسوب، به مدت

۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm در دمای 4°C سانتریفیوژ

گردید (۱۶،۱۵). الکل رویی به طور کامل خارج و

پس از خشک شدن، رسوب در ۳۰ میکرولیتر آب

تزریقی حل شد. DNA استخراج شده از نظر کیفیت

در ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

برای طراحی پرایمر توسط نرم افزار

Gene Runner از توالی حفاظت شده انتهای ۳' و ۵'

ژن BmK AGAP و توالی های مشابه آن از گونه های

مختلف عقرب که در سایت NCBI موجود می باشد،

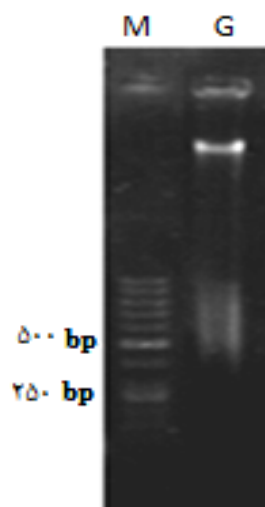
استفاده شد. این پرایمرها براساس بررسی همولوژی

طراحی شدند، یعنی با مطالعه توالی 3'-UTR و

5'-UTR توکسین های مشابه از پایگاه های اطلاعاتی و

یافته ها:

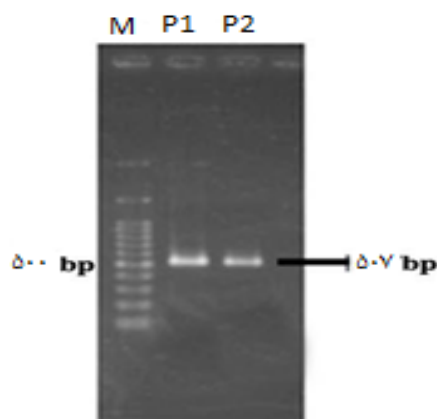
پس از استخراج DNA طبق پروتکل گفته شده در فصل ۲، ۱/۵ میکرولیتر از آن جهت بررسی کیفیت DNA، روی ژل آگاروز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه حاصل از این بررسی در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از بافت عقرب روی ژل آگارز ۱٪

(G: DNA ژنومی عقرب و M مارکر ۵۰bp (SM0371)

پس از انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن شبه آنتی تومور-ضددرد (AGAP)، برای تأیید تکثیر قطعه ژنی، بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه ژل آگارز، قطعه ای کمی بالاتر از ۵۰۰ جفت بازی را نشان داد (تصویر شماره ۲). اندازه ژن ۵۰۷ جفت باز به دست آمد که شامل ناحیه کد کننده ۲۵۵ جفت باز، اینترون ۲۱۶ جفت باز و ۳۳ جفت باز مربوط به ناحیه 5'-UTR و ۳ جفت باز هم مربوط به کدون خاتمه می باشد.



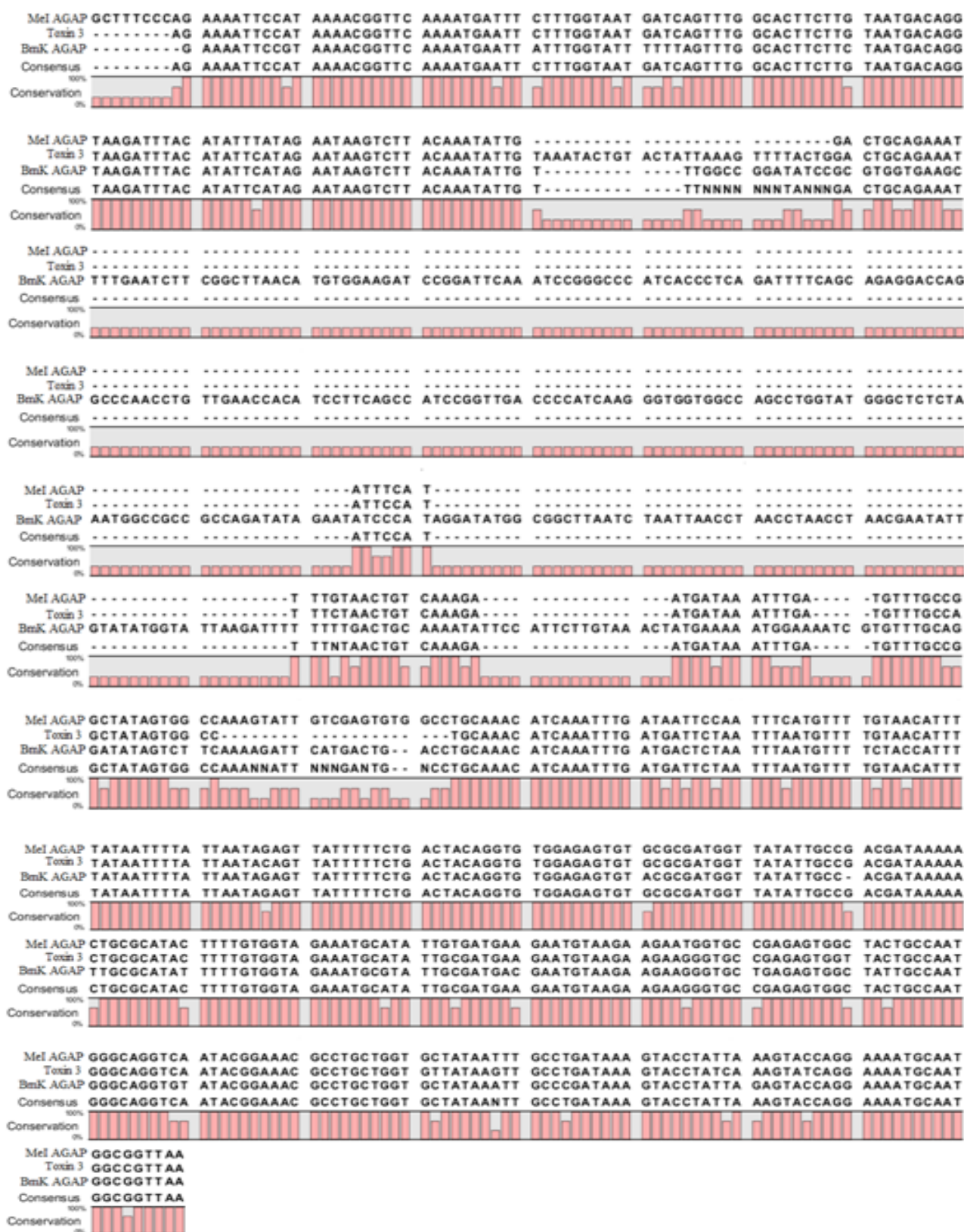
تصویر شماره ۲: تکثیر ژن مشابه AGAP بر روی

ژل آگارز ۱٪

P1 و P2 محصول PCR و M مارکر ۱۰۰ bp (SM0243)

پس از تکثیر قطعه اقدام به تعیین توالی توسط شرکت شد و سپس در بانک ژنی NCBI با شماره دسترسی KP188585 ثبت گردید؛ سپس توالی به دست آمده با توالی های BmK AGAP و MeVSCT-3 (Toxin 3) (شماره دسترسی در بانک ژنی EF445066) از نظر توالی ژنی، اینترون، عناصر تنظیمی و آدنین نقطه شاخه ساز برای انجام پیرایش مقایسه گردید (تصویر شماره ۳، ۴ و ۵) (۷).

نتایج حاصل از انجام این مقایسه با استفاده از نرم افزار 5 CLC workbench نشان داد که نواحی کد کننده ی سیگنال پپتید و پپتید بالغ تشابه بالایی با هم دارند؛ ولی اینترون آن ها با هم تفاوت زیادی نشان می دهد؛ همچنین اینترون ژن MeI AGAP نسبت به ژن های BmK AGAP و MeVSCT-3 کوتاه تر می باشد. اینترون و توالی های تنظیمی موجود در ژن توکسین های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 بررسی شد و موقعیت این عناصر تنظیمی بر روی اینترون این ژن ها با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Transcriptional Regulatory Element Database اطلاعات موجود در مورد BmK AGAP مشخص گردید (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۳: مقایسه توالی ژن MeI AGAP با ژنهای BmK AGAP و MeVSCT-3

این بررسی همولوژی با استفاده از نرم افزار 5 CLC main workbench انجام گرفت.

Buthus martensii BmK AGAP gene, *Mesobuthus eupeus* MeI AGAP gene, *Mesobuthus eupeus* MeVSCT-3(toxin3) gene

MeI AGAP Intron

5'gtaagatttacatatttatagaataagtcttacaatatggactgcagaaatatttcattttgtaactgtcaagaatgataaattgatgttgcc
ggctatagtgcccaagattgtcgagtggtgctgcaaacatcaaatgtataattccaatttcattgtttgtaacattttataattttattaataga
gttattttctgactacag-3'

BmK AGAP Intron

5'gtaagatttacatattcatagaataagtcttacaatatgtttggccggatatccgcgtggtgaagcttgaatctcggttaacatgtggaa
gatccggattcaaatccgggcccatcacctcagattttcagcagaggaccaggcccaacctgtgaaccacatccttcagccatccggttg
accccatcaagggtggtggccagcctggtatgggctctctaaatggccgcccagatatagaatatcccataggatatggcggttaatct
aattaacctaacctaacctaacgaatattgtatagtgtaagattttttgactgcataaatttcattctgtaaactatgaaaaatggaaaatc
gtgtttgcaggatatagtcctcaaaagattcatgactgacctgcaaacatcaaatgtgatgactctaatttaattgtttctaccattttataattttatta
atagagttattttctgactacag 3'

الف

MeI AGAP Intron

5'gtaagatttacatatttatagaataagtcttacaatatggactgcagaaatatttcattttgtaactgtcaagaatgataaattgatgttgcc
ggctatagtgcccaagattgtcgagtggtgctgcaaacatcaaatgtataattccaatttcattgtttgtaacattttataattttattaataga
gttattttctgactacag 3'

MeVSCT-3 Intron

5'gtaagatttacatattcatagaataagtcttacaatatgtttaaactgtactattaaagttttactggactgcagaaatattccattttctaactg
tcaagaatgataaatttgatgtttgccagctatagtggtgctgcaaacatcaaatgtgatgactctaatttaattgtttgtaacattttataattttatta
atagagttattttctgactacag 3'

ب

Intron BmK AGAP

5'gtaagatttacatattcatagaataagtcttacaatatgtttggccggatatccgcgtggtgaagcttgaatctcggttaacatgtggaa
gatccggattcaaatccgggcccatcacctcagattttcagcagaggaccaggcccaacctgtgaaccacatccttcagccatccggttg
accccatcaagggtggtggccagcctggtatgggctctctaaatggccgcccagatatagaatatcccataggatatggcggttaatct
aattaacctaacctaacctaacgaatattgtatagtgtaagattttttgactgcataaatttcattctgtaaactatgaaaaatggaaaatc
gtgtttgcaggatatagtcctcaaaagattcatgactgacctgcaaacatcaaatgtgatgactctaatttaattgtttctaccattttataattttatta
atagagttattttctgactacag 3'

Intron MeVSCT-3

5'gtaagatttacatattcatagaataagtcttacaatatgtttaaactgtactattaaagttttactggactgcagaaatattccattttctaactg
tcaagaatgataaatttgatgtttgccagctatagtggtgctgcaaacatcaaatgtgatgactctaatttaattgtttgtaacattttataattttatta
atagagttattttctgactacag 3'

ج

تصویر شماره ۴: الف) مقایسه توالی‌های تنظیمی و اینترون ژن‌های MeI AGAP و BmK AGAP؛ ب) مقایسه

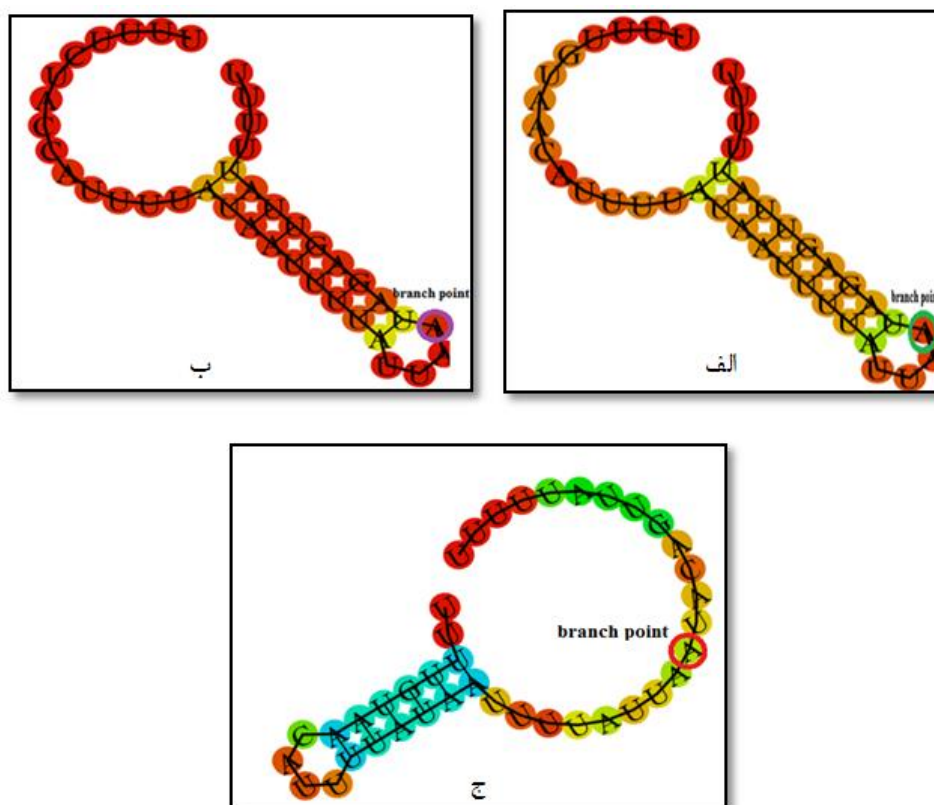
توالی‌های تنظیمی و اینترون ژن‌های MeI AGAP و MeVSCT-3؛ ج) مقایسه توالی‌های تنظیمی و اینترون

ژن‌های BmK AGAP و MeVSCT-3

نواحی سبز رنگ ناحیه مشابه در اینترون ژن‌ها، نواحی بنفش رنگ ناحیه‌ای با تفاوت توالی در اینترون ژن‌ها، جایگاه‌های پیرایش ۵' و ۳' به رنگ قرمز، آدنین نقطه‌ای شاخه‌ساز به رنگ زرد و توالی‌هایی که زیر آن‌ها خط کشیده شده است، عناصر تنظیمی در اینترون‌ها می‌باشند. این نتایج با استفاده از پایگاه اطلاعاتی *Transcriptional Regulatory Element Database* به‌دست آمده است.

شد. پیش‌بینی ساختار ثانویه ی RNA در اینترون ژن‌های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 نشان داد که آدنین نقطه انشعاب در اینترون ژن‌های MeI AGAP و BmK AGAP در لوپ سنجاق سری قرار دارد و انرژی تشکیل این ساختارها با استفاده از سرور RNAfold به ترتیب $-3/69$ و $-3/60$ کیلوکالری بر مول محاسبه شد، ولی آدنین نقطه انشعاب در اینترون ژن MeVSCT-3 در لوپ بزرگ قرار دارد و انرژی تشکیل این ساختار با استفاده از سرور RNAfold، $-1/59$ کیلوکالری بر مول محاسبه گردید (تصویر شماره ۵).

بررسی جایگاه های پیرایشی نشان داد که نوکلئوتیدهای محدوده ی جایگاه های پیرایشی ۳' و ۵' در اینترون ژن های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 مشابه بوده و به ترتیب AG/gtaaga و ctacag/GT می باشد، آنالیزهای سیستماتیک که بر روی اینترون ژن BmK AGAP انجام گرفت، نشان داد که آدنین نقطه ی شاخه‌ساز ۲۴ نوکلئوتید تا جایگاه پیرایش ۳' فاصله دارد (۷)، باتوجه به همولوژی بالای این ناحیه با توکسین تعیین توالی شده و همچنین توکسین MeVSCT-3 این آدنین نیز در اینترون این ژن ها به‌عنوان آدنین نقطه ی شاخه‌ساز در نظر گرفته



تصویر شماره ۵: الف) ساختار ثانویه ی RNA و موقعیت آدنین نقطه‌ی شاخه‌ساز در اینترون ژن MeI AGAP؛

ب) ساختار ثانویه ی RNA و موقعیت آدنین نقطه‌ی شاخه‌ساز در اینترون ژن BmK AGAP؛ **ج)** ساختار

ثانویه ی RNA و موقعیت آدنین نقطه‌ی شاخه‌ساز در اینترون ژن MeVSCT-3

این نتایج با استفاده از سرور RNAFOLD به‌دست آمده است.

بحث:

برای تکثیر توالی ژن MeI AGAP از پرایمرهای Fagp، Ragpn و Ragp استفاده شد. این پرایمرها براساس بررسی همولوژی بین توکسین های مشابه با توالی توکسین BmK AGAP و طبق ناحیه حفاظت شده در این توکسین ها طراحی شدند. پرایمرهای Fagp و Ragp براساس نواحی حفاظت شده ی 5'-UTR و 3'-UTR طراحی شدند، به علت اینکه میزان حفاظت شدگی ناحیه ی 3'-UTR پایین است و همچنین این ناحیه غنی از AT می باشد، پرایمر Ragpn برای اختصاصیت بیشتر از روی ناحیه 3'، DNA کد کننده پپتید بالغ برای انجام PCR- نستد طراحی شد. برای تکثیر این ژن از PCR- تاج داوون استفاده شد، این روش PCR برای تکثیر توالی هایی که پرایمرهای آن ها براساس بررسی همولوژی طراحی می شوند، مناسب ترین روش می باشد (۱۷). اندازه این ژن در گونه ی عقرب چینی بوتوس مارتنسی ۸۰۰bp بوده؛ اما اندازه محصول PCR قطعه ی موردنظر ۵۰۷bp به دست آمد که با تعیین توالی و بررسی های لازم مشخص شد که توکسین MeI AGAP دارای حذف بزرگی در ناحیه اینترونی می باشد.

مقایسه ی ژن های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 در تصویر شماره ۲ نشان داد که ناحیه ی کد کننده ی پپتید در این ۳ توکسین همولوژی بالایی با هم دارند، به گونه ای که مشابهت MeI AGAP و MeVSCT-3، ۹۷٪ و مشابهت MeI AGAP و BmK AGAP، ۹۱٪ به دست آمد؛ ولی شباهت توالی کد کننده ی پپتید بالغ بدون سیگنال پپتید بین توکسین های MeI AGAP و MeVSCT-3، ۹۶٪ و بین MeI AGAP و BmK AGAP، ۹۳٪ به دست آمد؛ ولی از لحاظ اینترون با هم متفاوت هستند، طول اینترون ژن های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 به ترتیب ۲۱۶، ۵۰۶ و ۲۲۳ نوکلئوتید می باشد، ژن هایی که دارای

اینترون بزرگ هستند، باید انرژی زیادی را صرف نسخه برداری از ژن کنند و همچنین تولید پروتئین از این ژن ها به علت بزرگ بودن اینترون ممکن است، به تأخیر بیفتد، از طرف دیگر، اینترون های بزرگ باعث ایجاد جایگاه های پیرایش مخفی در اینترون می شوند که در اتصال اگزون ها به هم خطا ایجاد می کنند (۱۸، ۱۹)؛ بنابراین کوچک بودن اینترون در ژن MeI AGAP دارای مزیتی برای این ژن می باشد.

در برخی از ژن ها توالی های تنظیمی که در نسخه برداری ژن ها مهم هستند، در اینترون آن ها می باشد. با استفاده از آنالیزهای آماری و روش های جهش زایی مشخص شده که توالی های تنظیمی در ژن های کد کننده ی توکسین های موثر بر کانال ها در عقرب، در اینترون آن ها وجود دارند. از جمله ی این عناصر تنظیمی می توان CAAT، CATG، TGAA(TTCA)، TATA، CAAAAT، AAAT، ATTA و TGGAAA را نام برد. بررسی این عناصر تنظیمی در اینترون ژن های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 نشان داد که برخی از این توالی های تنظیمی در اینترون ژن های MeI AGAP و MeVSCT-3 وجود ندارد، از جمله این توالی ها می توان CCGCG، GGCCA، CTAA، CAAAT، TGGAAA، TAATCTAATTA را نام برد. به توالی TGGAAA، عناصر تشدید کننده متصل می شود؛ بنابراین می توان گفت میزان ساخت این توکسین ها در گونه ی عقرب مزوبوتوس اوپتوس با گونه ی عقرب بوتوس مارتنسی متفاوت می باشد. نقش توالی های حذف شده ی دیگر در نسخه برداری از این ژن ها مشخص نیست.

ساختار RNA جایگاه پیرایش در اینترون ژن های MeI AGAP، BmK AGAP و MeVSCT-3 نشان داد که آدنین نقطه شاخه ساز در اینترون ژن های MeI AGAP و BmK AGAP روی لوپ سنجاق سری و در اینترون ژن MeVSCT-3 روی لوپ بزرگ

قرار گرفته است (تصویر شماره ۴)؛ همچنین فاصله ی آذنین نقطه ی انشعاب تا جایگاه پیرایش ۳' و نوکلئوتیدهای محدوده ی جایگاه پیرایش ۳' و ۵' در هر ۳ توکسین مشابه می باشد.

توسط Rui Ma و همکاران با استفاده از جهش زایی مشخص شد که در پپتید BmK AGAP پل های دی سولفیدی بین سیستمین های ۱۶-۳۶ و ۲۲-۴۶ و دمین مرکزی که شامل اسیدهای آمینه گلايسين-۱۷، آرژینین-۱۸، تریپتوفان-۳۸ و آسپارژین-۴۴ است، دارای فعالیت ضد درد می باشند (۱۲).

Youlong Zhao و همکاران عنوان کردند که AGAP تکثیر و مهاجرت سلولی را در سلول های گلیومای بدخیم انسانی SHG-44 مهار می کند. این توکسین با توقف سیکل سلولی و تداخل با مسیرهای سیگنالی MAPK، p-AKT و NF-K β تکثیر و مهاجرت را در سلول های SHG-44 مهار و فعالیت VEGF و MMP-9 را در سلول های SHG-44 سرکوب می کند (۱۰).

Chang Yin Li و همکاران خاصیت آنتی توموری این توکسین را بر روی سلول های کولورکتال SW480 آزمایش کرده و مشاهده کردند که این توکسین از طریق افزایش بیان P27 باعث توقف سیکل سلولی در فاز G1 شده و تکثیر را در سلول های سرطانی کولورکتال مهار می کند؛ همچنین از طریق افزایش بیان پروتئین های Bax و PTEN و سرکوب کردن فعالیت پروتئین های BCL-2، p-AKT و PI3K باعث القای آپوپتوز در این سلول های

سرطانی می شود (۱۱). Jin و همکاران با کلون کردن این ژن در وکتور حاوی پروموتور بیان شونده در سلول های سرطانی از این ژن به عنوان ژن خودکشی در از بین بردن سلول های سرطانی استفاده کردند (۲۰). با توجه به اهمیت پپتید آنتی تومور- ضد درد در درمان سرطان و تسکین درد و شباهتی ۹۳٪ بین توالی کد کننده ی این توکسین با MeI AGAP پس از بررسی عملکردی آن امید است که بتوان از آن برای درمان بیماران سرطانی و تسکین درد، استفاده کرد.

نتیجه گیری:

باتوجه به وجود مولکول های متعدد در سموم حیوانات و کاربردهای دارویی متنوع آن ها، در این پژوهش سم شبه آنتی تومور- ضد درد (AGAP) از گونه ی عقرب ایرانی مزوبوتوس اوپتوس مطالعه گردید و همچنین به بررسی تفاوت های نوکلئوتیدی آن با توکسین های کانال سدیم جهت بررسی خواص جدیدی از نظر عملکردی در این توکسین پرداخته شد. مقایسه ی توالی نوکلئوتیدی نشان دهنده تشابه زیاد آن با BmK AGAP بود که احتمال خاصیت ضد درد و ضد توموری آن را مطرح می کند.

تشکر و قدردانی:

از دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت مالی این پژوهش در قالب یک پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک با کد ۲۴۰۴۰۸ قدردانی می نمایم.

منابع:

1. Zhu S, Peigneur S, Gao B, Lu X, Cao C, Tytgat J. Evolutionary diversification of Mesobuthus alpha-scorpion toxins affecting sodium channels. Mol Cell Proteomics. 2012; 11(1): M111 012054.
2. Jalali A, Rahim F. Epidemiological review of scorpion envenomation in iran. Iran J Pharm Res. 2014; 13(3): 743-56.
3. Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochimie. 2000; 82(9-10): 861-8.

4. Ilkhanizade SH, Ayat H, Ahadi AM, Pirali K. Sequencing and comparative-bioinformatic analysis of chlorotoxin-like peptide from the Iranian scorpion *Mesobuthus eupeus*. *J Sharekord Univ Med Sci*. 2011; 13(5): 27-36.
5. Gati CD, Mortari MR, Schwartz EF. Towards therapeutic applications of arthropod venom k(+) -channel blockers in CNS neurologic diseases involving memory acquisition and storage. *J Toxicol*. 2012; 2012: 756358.
6. Nikonenko I, Bancila M, Bloc A, Muller D, Bijlenga P. Inhibition of T-type calcium channels protects neurons from delayed ischemia-induced damage. *Mol Pharmacol*. 2005; 68(1): 84-9.
7. Becerril B, Corona M, García C, Bolívar F, Possani LD. Cloning of genes encoding scorpion toxins: an interpretative review. *J Toxicol Toxin Rev*. 1995; 14(3): 339-57.
8. Bysani N, Daugherty JR, Cooper TG. Saturation mutagenesis of the UASNTR (GATAA) responsible for nitrogen catabolite repression-sensitive transcriptional activation of the allantoin pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1991; 173(16): 4977-82.
9. Liu YF, Ma RL, Wang SL, Duan ZY, Zhang JH, Wu LJ, et al. Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii karsch* in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2003; 27(2): 253-8.
10. Zhao Y, Cai X, Ye T, Huo J, Liu C, Zhang S, et al. Analgesic-antitumor peptide inhibits proliferation and migration of SHG-44 human malignant glioma cells. *J Cell Biochem*. 2011; 112(9): 2424-34.
11. Gu Y, Liu SL, Ju WZ, Li CY, Cao P. Analgesic-antitumor peptide induces apoptosis and inhibits the proliferation of SW480 human colon cancer cells. *Oncol Lett* 2013; 5(2): 483-8.
12. Ma R, Cui Y, Zhou Y, Bao YM, Yang WY, Liu YF, et al. Location of the analgesic domain in Scorpion toxin BmK AGAP by mutagenesis of disulfide bridges. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 394(2): 330-4.
13. Gu Y, Liu SL, Ju WZ, Li CY, Cao P. Analgesic-antitumor peptide induces apoptosis and inhibits the proliferation of SW480 human colon cancer cells. *Oncol Lett*. 2013; 5(2): 483-8.
14. Cui Y, Liu Y, Zhang R, Song Y, Jiang Z, Chunfu Wu, et al. Genomic cloning, characterization and statistical analysis of an antitumor-analgesic peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch*. *Toxicon*. 2010, 56(3): 432-39.
15. <http://www.protocol-online.org/biology-forumsposts/7139.html>.
16. http://openwetware.org/wiki/DNA_extraction_Salting_Out_protocol.
17. Fietto JL, DeMarco R, Verjovski-Almeida S. Use of degenerate primers and touchdown PCR for construction of cDNA libraries. *Biotechniques*. 2002; 32(6): 1404-8, 10-1.
18. Fedorova L, Fedorov A. Puzzles of the human genome: Why do we need our introns? *Cur Genomics*. 2005; 6(8): 589-95.
19. Diego-Garcia E, Caliskan F, Tytgat J. The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. *BMC Genomics*. 2014; 15: 295.
20. Jin S, Lin X, Guan H, Wu J. Cell-specific expression of the analgesic-antitumor peptide coding sequence under the control of the human alpha-fetoprotein gene promoter and enhancer. *Exp Ther Med*. 2015; 9(3): 863-7.

Bioinformatics analysis of analgesic-antitumor like peptide from Iranian scorpion *Mesobuthus eupeus*

Dehghan Z, Ayat H*, Ahadi AM

Genetics Dept., Shahrekord University, Sharekord, I.R. Iran.

Received: 2/Dec/2014 Accepted: 19/July/2015

Background and aims: In recent years, several studies have been conducted on animal and insect poisons with the aim of finding molecules with medicinal properties. Scorpion toxins have small molecules with different biological and pharmacological properties. One of these toxins is the analgesic- antitumor peptide (AGAP) that is effective in the treatment of cancer and pain. In this study, gene sequencing and bioinformatics analysis was performed to evaluate analgesic-antitumor like peptide from Iranian yellow scorpion *Mesobuthus eupeus*.

Methods: In this experimental study, Iranian scorpion *Mesobuthus eupeus* samples were isolated and the total DNA was extracted. AGAP-like gene was amplified with specific primers for conserved sequences and named MeIAGAP *Mesobuthus eupeus* Iranian AGAP. Then MeIAGAP sequences were compared with other similar gene from other species of scorpion by CLC main workbench 5 software. Furthermore, the introns sequence, regulatory elements, and the adenine branches point of this toxin examined with the same sequences.

Results: The sequence of MeI AGAP was 507 nucleotides long. The sequence of MeIAGAP gene is shorter than BmK AGAP gene sequences isolated from *Buthus martensii*, because MeI AGAP has a large deletion in intron sequences. Mature peptide sequences were similar about 93%. MeI AGAP gene sequences from Iranian yellow scorpion *Mesobuthus eupeus* was reported for the first time in this study.

Conclusion: Homology analysis showed multiple differences in sequences that can be specific for Iranian subspecies of this scorpion. Furthermore, MeIAGAP relief acts as drug for cancer and pain treatment due to its high similarity with analgesic-antitumor drug.

Keywords: Peptide like analgesic-antitumor, Gene sequencing, Intron regulatory factors, *Mesobuthus eupeus* Iranian scorpion.

Cite this article as: Dehghan Z, Ayat H, Ahadi AM. Bioinformatics analysis of analgesic-antitumor like peptide from Iranian scorpion *Mesobuthus eupeus*. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(3): 98-108.

*Corresponding author:

Genetics Dept., Shahrekord University, Sharekord, I.R. Iran. Tel: 00989133294917,
E-mail: ayat-h@sci.sku.ac.ir